

# Utilisation de la polyploidie pour l'amélioration genetique de l'igname

\*Travaux de création varietale sur l'espèce polyploide *D. alata*

\*Création d'hybrides interspecifiques à partir des espèces: *D.cayenensis* -*rotundata*, *D.trifida* et *D. alata*

# Niveaux de ploïdie des différentes sp

IRD

- *Dioscorea Rotundata*  
Scarcelli N *et al.* 2005. *Theor Appl Genet* 111: 226–232

INRA

- *Dioscorea Trifida*  
Bousalem M., Arnau G *et al.* 2006.  
*Theor Appl Genet* 113:439-451

CIRAD

- *Dioscorea Alata*  
Arnau *et al.*

AFRIQUE

- $2n = 40 = 4x ? \rightarrow 2x$   
diploïdes

AMERIQUE

- $2n=80 = 8x? \rightarrow 4x$   
Autotetraploïdes

ASIE

- $2n = 40 = 4x? \rightarrow 2x$
- $2n = 60 = 6x? \rightarrow 3x$
- $2n = 80 = 8x? \rightarrow 4x$

# Segrégation des marqueurs microsatellites et niveaux de ploïdie

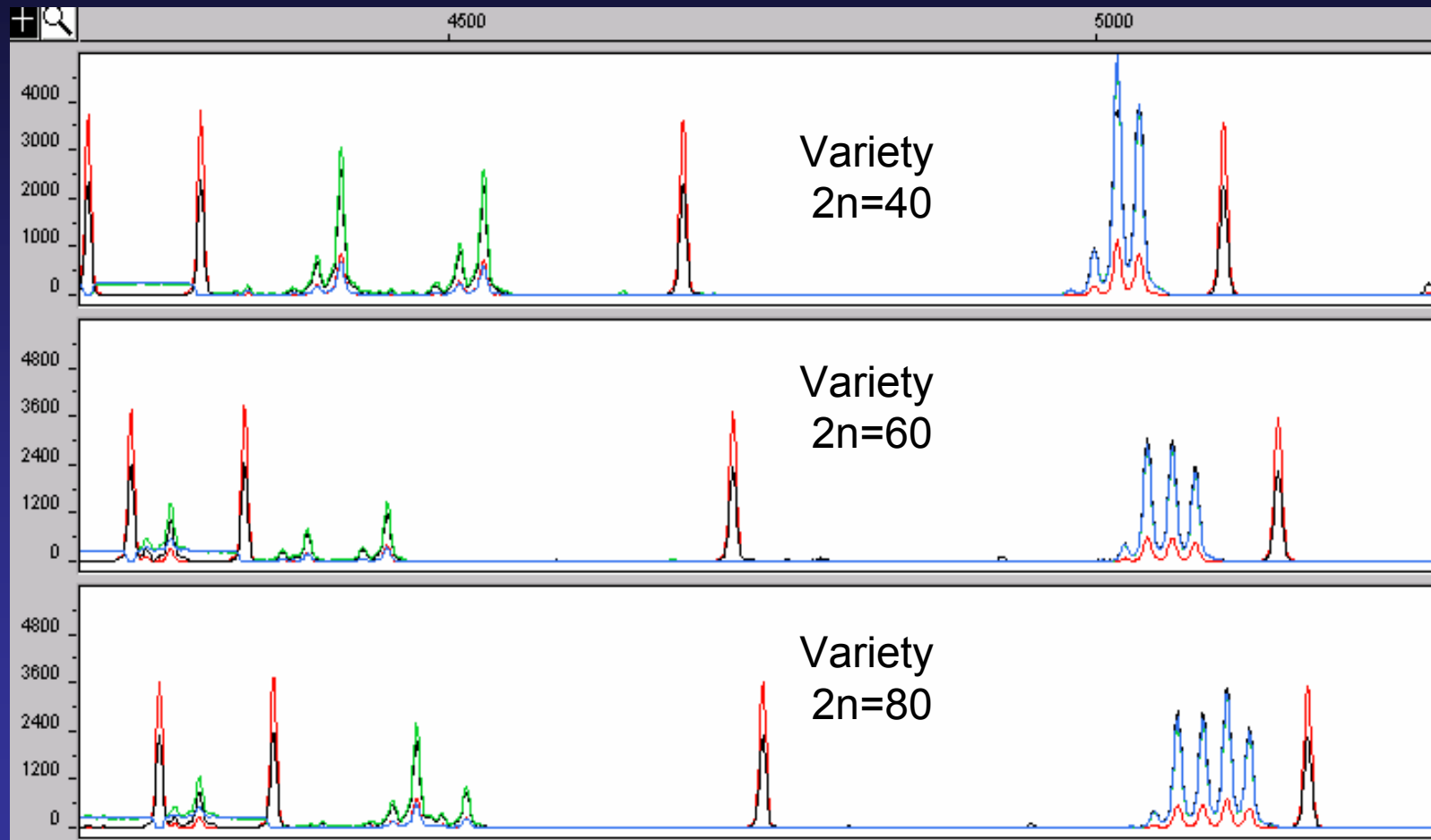
- Analyses de ségrégation effectuées sur 4 descendances: ♀(2n=40) x ♂(2n=40)
- Utilisation de la méthode Bayésienne (Olson, 1997) qui est plus pertinente que le test du  $X^2$ :
  - permet de tester un nombre élevé d'hypothèses
  - permet de traiter des génotypes non attendus
  - Programme fait par J.David

## Facteur de Bayes :

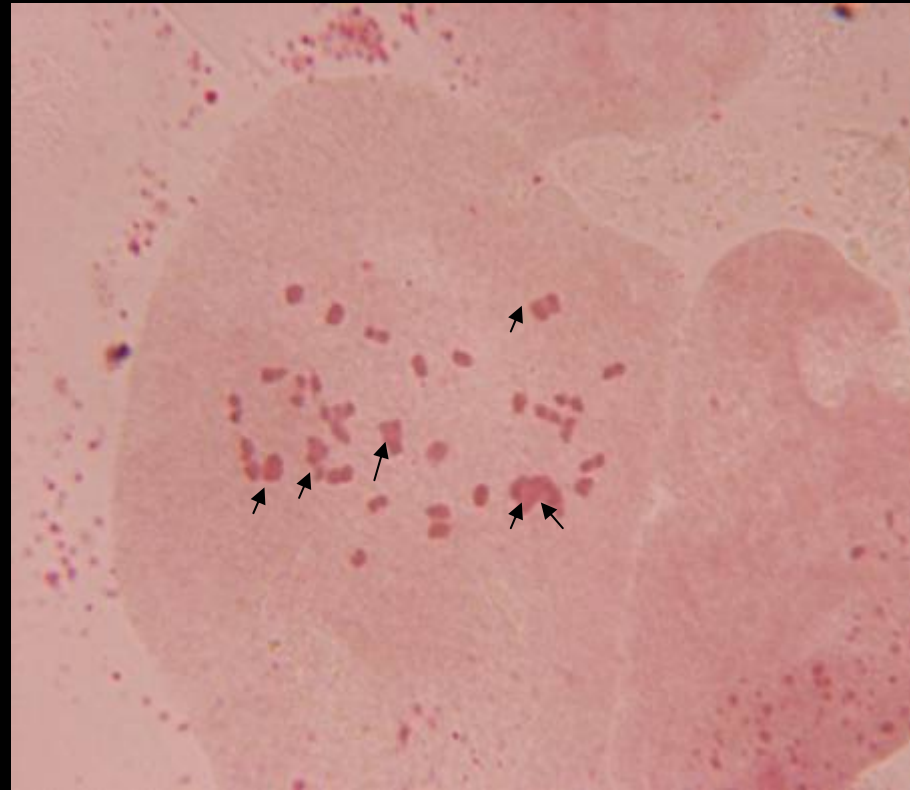
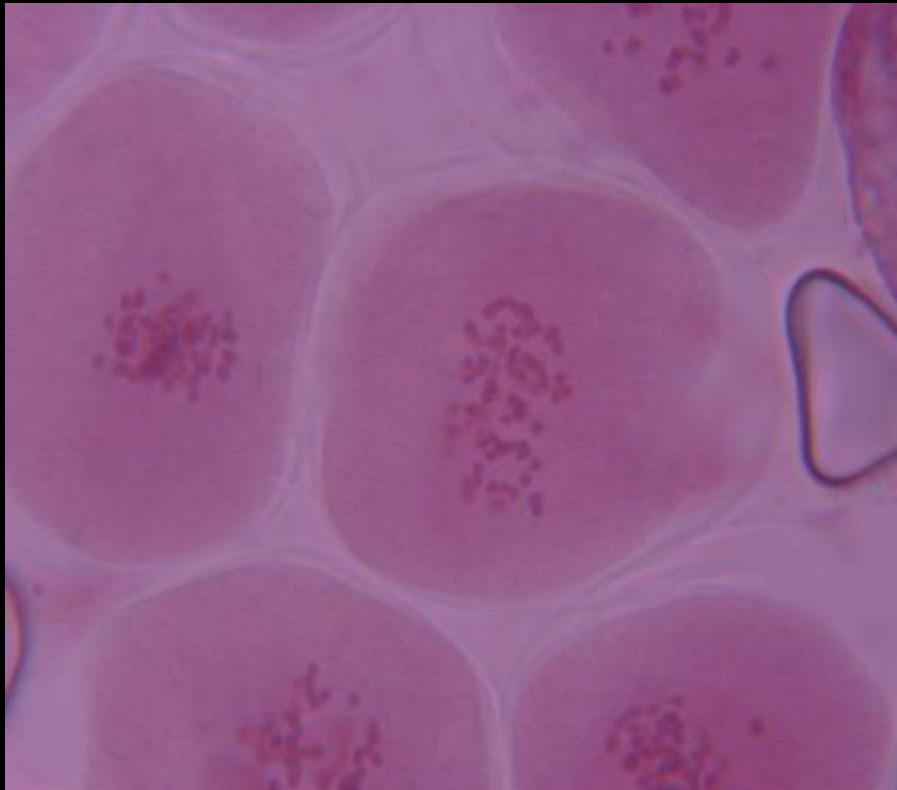
$$BF = \Pr(\text{data} \mid \text{disomy}) / \Pr(\text{data} \mid \text{tetrasomy}) = \frac{\sum \Pr(\text{data} \mid \text{Scenario } j, 2X)}{\sum \Pr(\text{data} \mid \text{Scenario } i, 4X)} = \frac{\sum_i \sum_j L(f_i, m_j, 2X)}{\sum_i \sum_j L(f_i, m_j, 4X)}$$



# Typical electrophoregram after multiple sample loading



# *Indo- French Project CIRAD-CTCRI:* Genetic Improvement of Yam Using DNA Markers



Meiosis of  $2n = 80$  types shows majority of bivalents and some tetravalents, indicating autotetraploidy





# **Programme de création variétale sur l'espèce polyploïde *D. alata***

**Objectif:**

**Creation de nouvelles variétés associant  
productivité, résistance à l'antracnose et qualité  
du tubercule**

**5 12 2006**



# Collection Ressources Génétiques

- 150 genotypes de *D.alata* provenant de différents pays (Vanuatu India...)
- Collection originale et diversifiée pour les caractères d'intérêt agronomique: rendement , résistance à l'antracnose et les différentes caractéristiques du tubercule: couleur, forme, nombre de tubercules...





# Polyploïdie

$2n=40$



Fertile

$2n=60$



Sterile

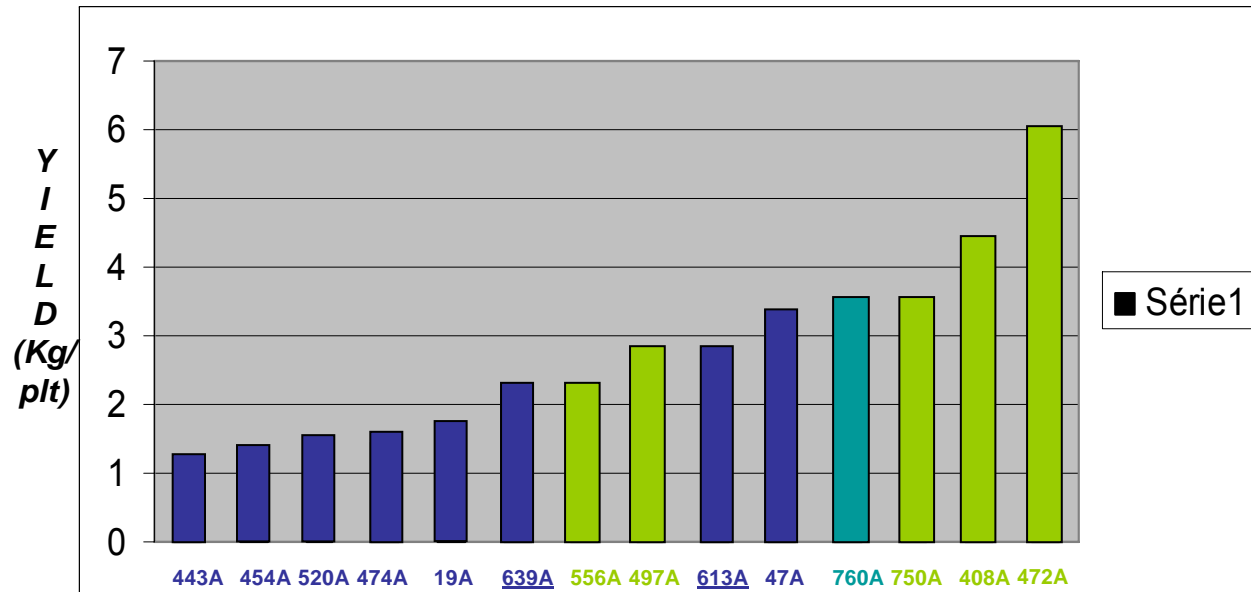
$2n=80$



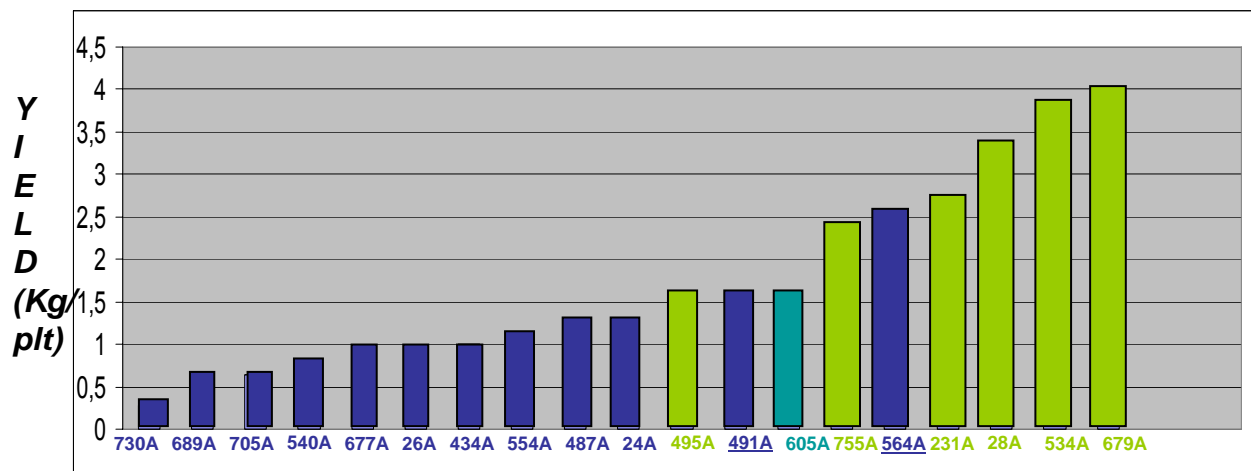
Fertile

- Les variétés à haut niveaux de ploidie sont plus vigoureuses et ont un potentiel de rendement supérieur
- La création variétale s'est focalisée jusqu'à 2005 uniquement sur la création de variétés diploïdes

**Fig: Tuber yield of *Dioscorea alata* accessions with different ploidy levels.  
Accessions with  $2n=40$ ,  $60$ ,  $80$  chromosomes**



Serie 1:  
seminces



Serie 2:  
vitroplants



# Clones florifères di et tetraploïdes

Male  $2n=40$



Femelle  $2n=40$



Male  $2n=80$



Femelle  $2n=80$



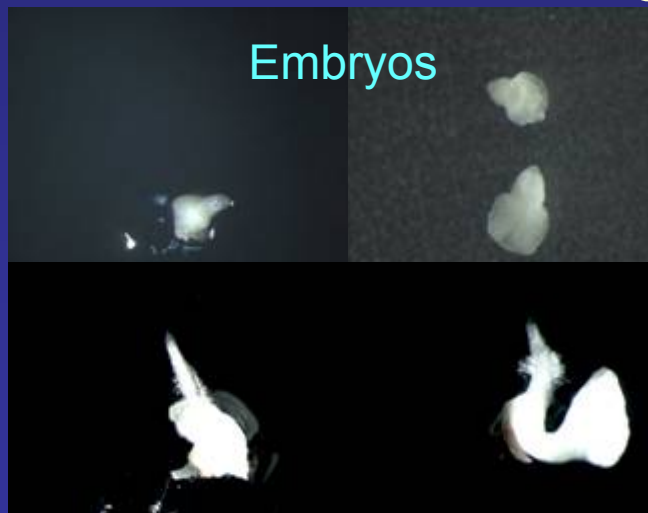
# Production d'hybrides polyploïdes

- Des hybrides triploïdes ont été produits pour la première fois en 2005 (le sauvetage des embryons immatures in vitro a été nécessaire): ♀ ( $2n=40$ ) x ♂ ( $2n=80$ )
- Des croisements reciproques ♀ ( $2n=80$ ) x ♂ ( $2n=40$ ) ont été effectués en 2007 : le développement des graines est normal
- Des hybrides tetraploïdes tetraploïdes ( $2n = 80$ ) ont été produits pour la première fois en 2006
- 400 triploïdes and 570 tetraploïdes sont en cours d'évaluation pour identifier les lignées prometteuses



# Rescue of triploid immature embryos in vitro

- Almost all seeds were found to contain embryos but with an abnormal development of endosperm tissue
- A method for rescuing immature embryos was developed that could be used to obtain seedlings

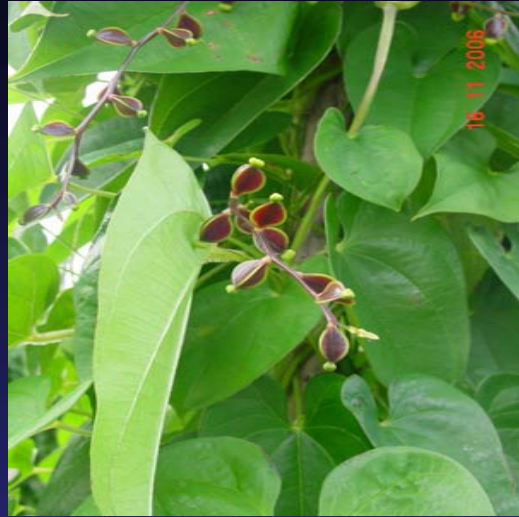








# Production of tetraploid hybrids









# **Molecular marker heterozygosity determination using microsatellite markers**

Plant material:

A sample of 96 *D. alata* varieties with different ploidy levels and different geographic origins (69 tetraploid, 11 hexaploid and 16 octoploid) were selected for this study

Genetic analysis:

10 microsatellites were used (Da2F10, Da3G04, Da1F08, Da1F07, Da1A01, Dab2E07, Dab2D11, Dpr3E10, Dpr3B1, Dpr3F04)

# Number of homozygote and heterozygote clones depending on the ploidy levels ?

Ploidy	Allelic status	Loci									
		Da2F10	Da3G04	Da1F08	Da1F07	Da1A01	Dab2E07	Dab2D11	Dpr3E10	Dpr3B12	Dpr3F04
2n=40	Homozygous	7	16	19	67	13	22	20	57	27	35
	Heterozygous	62	53	50	2	56	47	49	12	42	34
2n=60	Homozygous	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1
	Heterozygous	11	11	11	10	11	11	11	10	11	10
2n=80	Homozygous	0	1	0	7	0	0	0	3	0	1
	Heterozygous	16	15	16	8	16	16	16	13	16	15

**Table 3:** Number of homozygote and heterozygote clones according to ploidy level.

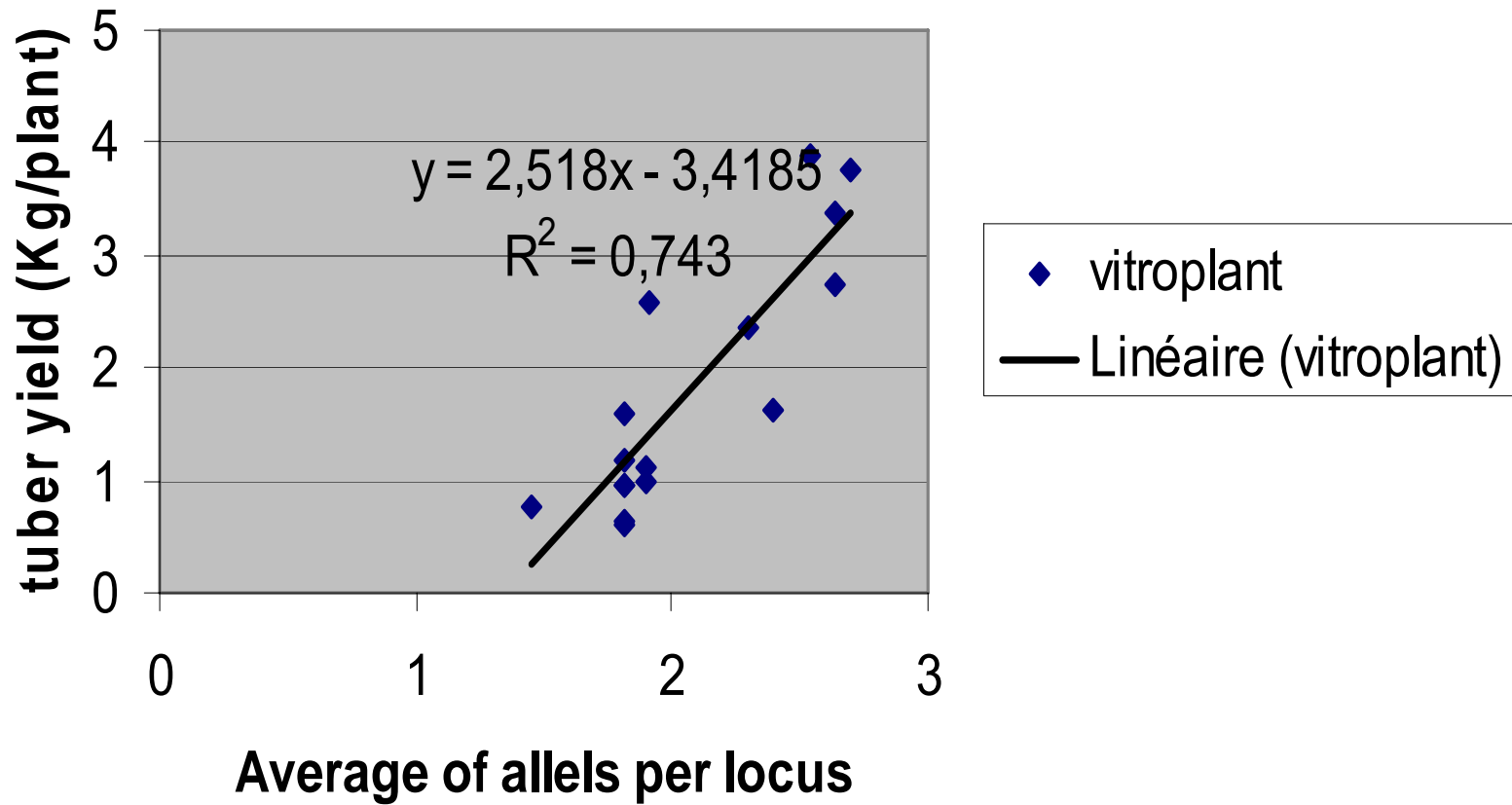
# Heterozygote or homozygote state depends on the ploidy level?

Loci	6x/4x	8x/4x
Da2F10	NS	NS
Da3G04	NS	NS
Da1F08	S*	S*
Da1F07	S***	S***
Da1A01	NS	NS
Dab2E07	S*	S**
Dab2D11	S*	S*
Dpr3E10	S***	S***
Dpr3B12	S**	S**
Dpr3F04	S**	S***
Σ loci	S***	S***

**Table 4:** Results of  $X^2$  tests proving the hypothesis that homozygote or heterozygote status depends on the ploidy level. (NS: non significant)

$P > 0.05$ , \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

# Correlation of tuber yield with molecular marker heterozygosity





# CONCLUSION

- Triploid and tetraploid varieties are more heterozygotic than diploid varieties which could explain their superior performance observed in the field
- Production of triploid and tetraploid appears promising for the genetic improvement of the greater yam, making it possible to maximise heterozygosity and heterosis.

# Diversité allélique de la collection à l'aide de marqueurs SSR

- Caractérisation de la collection : 150 accessions X 25 marqueurs
- Outil: séquenceur capillaire ABI- 310 (Inserm Guadeloupe) .  
Multiplexage de 3 locus marqués avec trois fluorochromes FAM, TET et HEX
- Analyses réalisées:
  - Calcul des distances génétiques à partir d' une matrice 0/1, distance de Nei et Li
  - Utilisation des résultats obtenus dans le choix des variétés à croiser, afin de maximiser l'hétérozygotie
- Travail en cours:
  - Analyse des données en tant que marqueurs co-dominants
  - Dosages alléliques des accessions 3x et 4x: technique MAC-PR (Esselink *et al.*, 2004)
  - Quel type d'analyses pour des variétés avec différents niveaux de ploïdie ?

# Diversité des caractères d'intérêt agronomique dans la collection

Ploïdie	Caractères d'intérêt agronomique		
	Résistance	Qualité	N° tubercules
Niveau 2x	+++,++ +, -	+++,++ +, -	1-10
Niveau 4x	++, +, -	+++,++ +, -	1-2

# STRATEGIE DE PRODUCTION D'HYBRIDES POLYPLOIDES

**2x**      **X**      **4x**  
Résistants      ↓      distants génétiquement des 2x  
N°élevé de tub      pour maximiser l'hétérosis

Production d'hybrides **3x** à haut rendement (très hétérozygotes)  
-avec plusieurs tubercules  
-résistants à l'anthracnose

**2x elite** (résistants, qualité et n°élevé de tubercules)  
↓      **Doublement à la colchicine**

**4x**      **X**      **4x**  
distants génétiquement des 2x- doublés  
pour maximiser l'hétérosis

Production d'hybrides **4x** à haut rendement (très hétérozygotes)  
-avec plusieurs tubercules  
-résistants à l'anthracnose



# Production of new $2n=80$ parental lines by doubling chromosomal stock from $2n=40$ elite varieties using traitement colchicine

$2n=40$  heterozygote elite varieties  $\blacktriangleright$   $2n=80$  varieties  
(ab) (aabb)

hybrids production:

- when crossing  $2n=80$  variety X  $2n=40$  variety  
(aabb) (cd)  
 $\downarrow$   
: 66 % of ab hybrids

- If using very heterozygote  $2n=80$ :  
higher variability and biggest work  
 $2n=80$  varieties X  $2n=40$  varieties  
(abcd) ef  
 $\downarrow$   
ab,ac, ad, bc, bd cd hybrids

# Production of $2n=80$ lines by doubling chromosomal stock from $2n=40$ elite varieties using traitement colchicine

Clone CTRT-177



↓  
 $2n=40$

↓  
 $2n=80$

# Production of $2n=80$ lines by doubling chromosomal stock from $2n=40$ elite varieties using traitement colchicine

vitroplants



Seedlings



# Intérêt des hybrides triploïdes et tétraploïdes pour les systèmes de culture en voie de sédentarisation en Afrique de l'Ouest:

- Rendements plus élevés que les diploïdes
- Il devrait être possible d'obtenir des rendements équivalents de ceux des clones diploïdes après jachère, dans des sols de faible fertilité.

# Création d'hybrides interspécifiques à partir des espèces: *D.cayenensis* - *rotundata*, *D.trifida* et *D. alata*

- Croisements *D. trifida* X *D. alata*:
  - $2n=80 \times 2n=40$
  - $2n=80 \times 2n=80$
- Croisements *D. alata* X *D. cayenensis-rotundata*:
  - $2n=40 \times 2n=40$
  - $2n=40 \times 2n=80$
  - $2n=80 \times 2n=80$



# *D. Trifida* X *D. alata*



$2n=80$



$2n=80$

# *D. alata* X *D. cayenensis-rotundata*



$2n=80$



$2n=80$









# Projet de thèse d'A. Nemorin

- **Obj 1:** Acquérir des connaissances sur la génétique des *D. alata*, par l'étude de la ségrégation des marqueurs microsatellites au niveau 2x et 4x:
  - Type de ségrégation des tetraploïdes?
  - Distorsions de ségrégation (hétérosis structurelle)?
- **Obj 2:** Déterminisme génétique de plusieurs caractères importants sur la descendance 2x: n°tubercules, oxydation de la chair...
- **Obj 3:** Etablir une cartographie partielle des génotypes 2x et 4x les plus intéressants